

⑩ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 39 17 949 A1

⑩ Int. Cl. 5:
C07K 15/06

C 07 K 3/20
C 07 K 3/26
A 61 K 37/02

⑪ Anmelder:

Schering AG, 1000 Berlin und 4709 Bergkamen, DE

⑪ Erfinder:

Donner, Peter, Dipl.-Bio-Chem. Dr., 1000 Berlin, DE

⑩ Neues Thrombolytikum

Die vorliegende Erfindung umfaßt das Thrombolytikum v-PA mit einer in Gegenwart von Fibrin fibrinolytischen Wirk- samkeit aus dem Speichel von Fledermäusen der Gattung *Desmodus spec.*, das ein Molekulargewicht von 40000 ± 3000 besitzt.

DE 39 17 949 A1

DE 39 17 949 A1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Thrombolytikum, Verfahren für seine Isolierung und seine pharmazeutische Verwendung.

5 Thrombosen entstehen durch die Bildung eines Blutgerinnsels in Blutgefäßen. Man unterscheidet venöse Thrombosen einschließlich der Lungenembolien und arterielle Thrombosen einschließlich des akuten Herzinfarkts.

Lungenembolie und Herzinfarkt sind lebensbedrohliche Ereignisse, die einer medizinischen Sofortintervention bedürfen.

10 Neben verschiedenen invasiven Methoden hat sich in den letzten Jahren die enzymatische Thrombolyse mit Plasminogenaktivatoren als Therapieform für arterielle und venöse Thrombosen durchgesetzt. Diese als Thrombolytika bezeichneten Stoffe wandeln Plasminogen, das inaktive Proenzym des Fibrinolysesystems im Blut, in das aktive proteolytische Enzym/Plasmin um. Plasmin wiederum löst den Faserstoff Fibrin, ein wesentlicher Bestandteil eines Blutgerinnsels, auf, was zur Wiedereröffnung der verschlossenen Gefäße und zur Rekonstitution des Blutflusses führt. Plasmin jedoch ist eine relativ unspezifische Protease, das heißt, einmal im Blut gebildet, zerstört sie proteolytisch Komponenten im Blut, die für eine intakte Hämostase unerlässlich sind (z.B. Fibrinogen), und induziert dadurch unter Umständen gefährliche Blutungsrisiken.

Die Thrombolytika der ersten Generation, Streptokinase und Urokinase sind Stoffe, die, einmal in die Zirkulation injiziert, systemisch Plasminogen in Plasmin umwandeln und eine systemische Proteolyse induzieren.

20 Thrombolysetherapien mit diesen Stoffen sind daher häufig von Blutungskomplikationen begleitet. Die daraufhin entwickelte fibrinspezifische Thrombolyse, bei der rekombinierte Plasminogenaktivatoren vom Gewebetyp, kurz t-PA genannt, eingesetzt werden, sollte aus diesem Dilemma herausführen. t-PA hat im Blutkreislauf eine nur geringe Affinität zu Plasminogen. In Gegenwart des Faserstoffs Fibrin jedoch, mit dem es über spezifische Bindungsstellen reagiert, erhöht sich diese Affinität um ein Vielfaches, was in einer Plasminbildung an der 25 Thrombusoberfläche resultiert. Dieses Konzept konnte in vitro und in tierexperimentellen Untersuchungen verifiziert werden: die klinischen Studien ergaben jedoch, daß große Mengen t-PA nötig sind, um die rasche Auflösung einer Koronarthrombose zu bewirken.

Infundiert man aber derart hohe Dosen t-PA, führt das ähnlich wie in den Fällen von Streptokinase und Urokinase zu einer systemischen Proteolyse verbunden mit einem relativen Blutungsrisiko. Man spricht daher 30 heute von einer relativen Fibrinspezifität des t-PA. Die Ursache dafür liegt in einer wesentlichen Eigenschaft des t-PA begründet: Dieses Molekül ist eine aktive Protease, die unter günstigen Bedingungen (hohe Enzymkonzentration, lange Expositionszeit, hohe Substratkonzentration, optimaler pH und Ionenmilieu) Plasminogen auch in Abwesenheit von Fibrin zu Plasmin umwandelt. Alle diese Bedingungen sind bei der derzeitigen klinischen Standardtherapie mit t-PA erfüllt.

35 Bei der Suche nach spezifischeren Plasminogenaktivatoren, die das Kriterium der Fibrinspezifität erfüllen, wurde ein neuer, natürlicher, fibrinolytisch wirksamer Stoff mit der Bezeichnung v-PA gefunden.

Die Erfindung betrifft den thrombolytischen Wirkstoff v-PA aus dem Speichel von Fledermäusen der Gattung Desmodus spec., der durch die folgenden charakteristischen Eigenschaften gekennzeichnet ist:

40 – Die Haupt-Protein-Bande des Wirkstoffs zeigt in der Sodiumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von $40\ 000 \pm 3000$.
 – Die Aktivität des Wirkstoffs eluiert von einer Gelfiltrationssäule (Superose 12) unter einem Molekulargewicht von $40\ 000 \pm 3000$ (Abb. 3).
 – Die isoeketrischen Punkte (pI) des Wirkstoffs liegen zwischen 6,8 und 8,5.
 – Der Wirkstoff reagiert mit 3H-Diisopropylfluorophosphat und ist daher eine Serinprotease.
 – Der Wirkstoff reagiert nicht mit einem polyvalenten Anti-t-PA-Antiserum und ist demzufolge immunologisch nicht identisch mit t-PA.
 – Der Wirkstoff wird nicht durch den Plasminogenaktivator-Inhibitor Z (PAI-2) gehemmt.
 – Der Wirkstoff hydrolysiert die chromogenen Peptide H-D-Ile-Pro-Arg-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA und < Glu-Gly-Arg-pNA, jedoch nicht das chromogene Peptid H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.
 – Der Wirkstoff bindet in einem pH-Bereich von 4 – 10,5 nicht an Lysin-Sepharose (Abb. 9).
 – Der Wirkstoff erzeugt Lysehöfe auf Fibrinplatten, dagegen nicht auf Caseinplatten.
 – Der Wirkstoff bindet bei pH 7,5 an Zn^{++} -Chelat-Sepharose (Abb. 1).
 – Der Wirkstoff aktiviert Plasminogen nur in Gegenwart von Stimulatoren wie Fibrin, nicht aber in Gegenwart von Fibrinogen (Abb. 5).
 – Der Wirkstoff lysiert konzentrationsabhängig humane Vollblut-Thromben in vitro (Abb. 6 und 7).
 – In einem rekonstituierten, gerinnbaren in vitro System führt der Wirkstoff im Gegensatz zu t-PA zu keinem meßbaren Fibrinogenabbau (Tab. 1).
 – In einem in-vitro-Fibrinolysetest (International Clot-Lysis-Assay) erzeugt der Wirkstoff eine konzentrationsabhängige Fibrinolyse (Abb. 8).

Der thrombolytische Wirkstoff v-PA stellt einen neuen, natürlich vorkommenden Plasminogenaktivator dar, der Blutgerinsel im menschlichen Körper auflöst und somit zur Behandlung z.B. des Herzinfarktes geeignet ist.

65 Er findet sich im Speichel aller Species von Fledermäusen der Gattung Desmodus spec. in geringen Konzentrationen und wird wahrscheinlich von den Zellen der Speicheldrüsen dieser Tiergattung exprimiert. Die Fledermäuse der Gattung Desmodus spec. umfassen alle Fledermaus-Arten des amerikanischen Kontinents. Besonders gut wurde die Gattung Desmodus Mittelamerikas und Mexikos untersucht.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Isolierung des Thrombolytikums v-PA, aus dem Speichel von

Desmodus spec. gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den zentrifugierten Speichel in einem Puffer aufnimmt, über eine $2n^{++}$ -Chelat-Sepharosesäule chromatographiert, nach Waschen der Säule den Wirkstoff v-PA quantitativ eluiert, die gesammelten Fraktionen über Superose 12 in Abwesenheit von Salzen gelfiltriert und anschließend nochmals in Gegenwart einer physiologischen Salzlösung gelfiltriert. Die genauen Verfahrensparameter sind im Beispiel 1 wiedergegeben.

Der Vorteil des vorgenannten Verfahrens besteht in einer deutlich gesteigerten Reinheit des üblichen v-PA's. Es wurde gefunden, daß in Abwesenheit von Salzen bei der 1. Gelfiltration v-PA sich nicht wie ein Protein mit einem MG von ca. 40 000 verhält, sondern durch Konformationsveränderung unspezifische Bindungen an die Gel-Matrix (Superose 12; Pharmacia, Schweden) die Ursache für das überraschende Eluierverhalten sein können.

Die Erfindung beinhaltet ferner Arzneimittel auf Basis der Verbindung v-PA sowie üblichen Hilfs- und Trägerstoffen.

Die Überlegenheit des neuen Thrombolytikums v-PA gegenüber t-PA geht aus den nachfolgenden Beispielen 2, 3, 5 und 6 hervor.

Beispiel 1

Aufarbeitung von 60 ml Speichel-bestand aus der Vampirfledermaus Desmodus rotundus

a) Zn^{++} + chelat Sepharose Chromatographie

60 ml Speichel bei 4°C und 6000 × g zentrifugiert. Dieser Überstand wird auf 20 mM Tris pH 7,5/100 mM NaCl/0,01% Pluronic F 68 eingestellt. Dieser Überstand wird auf eine Chromatographiesäule, welche mit 200 ml Chelat-Sepharose fast flow gefüllt und mit 10 mM Tris pH 7,5/100 mM NaCl/1 mM Imidazol/0,01% Pluronic F 68 äquilibriert war, gegeben. Die Säule wird mit diesem Puffer gewaschen bis die optische Dichte, gemessen bei 280 nm die Basislinie erreicht hat (ca. 600 ml). Danach wird das v-PA mit einem Gradienten von 1 – 50 mM Imidazol (1000 ml) in 10 mM Tris pH 7,5/100 mM NaCl/0,01% Pluronic F 68 eluiert (Abb. 1). Dieser Reinigungs- schritt wird bei 4°C durchgeführt.

b) Gelfiltration ohne NaCl

5 ml einer v-PA haltigen Fraktion aus der Zn^{++} chelat Sepharose Chromatographie wird über eine Superose 12 HR16/50 Chromatographiesäule (Pharmacia) in 20 mM Tris pH 8,0/0,01% Pluronic F 68 mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Pharmacia) chromatographiert (Abb. 2).

Mit diesem Reinigungsschritt trennt man eine Protease ab, die keinerlei fibrinolytische Aktivität besitzt. Die Fraktionen mit v-PA-Aktivität wurden gepoolt.

c) Gelfiltration mit NaCl

2 ml des oben beschriebenen V-PA Pools werden durch Gefriertrocknung auf 0,2 ml konzentriert und in 50 mM Tris pH 8,0/160 mM NaCl/0,01% Pluronic F 68 über eine Superose 12 HR 10/30 Chromatographiesäule (Pharmacia) mit Hilfe einer FPLC Anlage (Pharmacia) chromatographiert (Abb. 3).

Das v-PA eluiert als homogener scharfer Peak mit einem Molekulargewicht von ca. 40 000.

Das Ergebnis der Reinigung ist in Abb. 4 zusammengefaßt.

Abb. 4A zeigt in der nichtreduzierenden SDS Polyacrylamidelektrophorese mit der sensitiven Silberfärbemethode eine Probe aus jeder Reinigungsstufe. Abb. 4B zeigt, daß v-PA aus einer Proteinkette besteht, denn bei der Spaltung der Disulfidbrücken durch DTT spaltet sich das Molekül nicht in zwei Proteinbändern auf. Es kommt nur zu einer scheinbaren Erhöhung des Molekulargewichts, was durch die Liniarisierung der Proteinkette durch DTT zu erklären ist.

Die Aktivität des Wirkstoffs v-PA, kenntlich durch einen Lysehof im Indikatorgel, korrespondiert mit einer Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von $40\,000 \pm 3000$. Der Lysehof läßt sich ausschließlich auf plasminogenhaltigen Fibrin-Indikatorgelen nachweisen, nicht aber auf plasminogenfreien Fibrin-Indikatorgelen oder auf plasminogenhaltigen Casein-Indikatorgelen. t-PA, welches man einem identischen Prozeß unterzieht, erzeugt auch auf plasminogenhaltigen Casein-Indikatorgelen Lysehöfe.

Die Aktivität des gereinigten Wirkstoffs v-PA ist also identisch mit einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von $40\,000 \pm 3000$, welches Plasminogen in Gegenwart von Fibrin in Plasmin umwandelt, welches zur Auflösung des Faserstoffs Fibrin führt. Im Gegensatz zu t-PA, welches auch in Gegenwart von Casein Plasminogen aktivieren kann, ist v-PA nicht in der Lage, Plasminogen in Gegenwart von Casein in Plasmin umzuwandeln.

Die vorliegende Erfindung läßt sich weiterhin anhand der folgenden Beispiele charakterisieren:

Beispiel 2

Vergleich der Plasminogenaktivierung des nach Beispiel 1 gereinigten Wirkstoffs v-PA mit t-PA

Inkubiert man einen spezifischen Plasminogenaktivator (PA) mit genügend hoher Konzentration an Plasminogen (PLG) in einem Puffermilieu, z.B. 50 mM Tris pH 7,4, 20 mM NaCl bei 37°C, dann entsteht Plasmin nach folgendem Prinzip:

1. PA + PLG (\pm Stimulator)[PA/PLG (\pm Stimulator)] PA + Plasminogen (\pm Stimulator)

Das gebildete Plasmin lässt sich nachweisen mit einem für diese Protease weitgehend spezifischen chromogenen Tripeptid H-D-Val-Leu-Lys-pNA. Diese Reaktion verläuft nach folgendem Prinzip:

5 2. Plasmin + H-D-Val-Leu-Lys-pNA [Plasmin/H-d-Val-Leu-Lys-pNA] Plasmin + pNA

Die Entstehungsrate von pNA lässt sich photometrisch bei 405 nm bestimmen und ist der Konzentration des Enzyms Plasmin proportional. Koppelt man die beiden Prinzipien 1 und 2, lässt sich also auch die Entstehungsrate von Plasmin messen, was ein Ausdruck der Aktivität des Plasminogenaktivators ist. Abb. 5 zeigt die Plasminentstehungsraten von t-PA und von v-PA in Abwesenheit und in Gegenwart der Stimulatoren Fibrinogen (dem Gerinnungssubstrat) und Fibrin (dem aufzulösenden Faserstoff in Blutgerinnsele).

10 t-PA aktiviert demzufolge Plasminogen auch in Abwesenheit eines Stimulators und mit sehr hoher Aktivierungsrate auch in Anwesenheit von Fibrinogen. v-PA aktiviert Plasminogen im beschriebenen Testansatz ausschließlich in Anwesenheit des Faserstoffs Fibrin. (Der Test wird auf 96-Loch-Mikrotiter-Platten durchgeführt. Jedes Loch enthält ein Gesamtvolume von 220 μ l. Die Konzentration von Plasminogen beträgt 0,5 μ M: von H-D-Val-Leu-Lys-pNA 0,68 mM: von t-PA 0,05 IU; die eingesetzte Aktivität von v-PA, ermittelt im International Clot-Lysis-Assay (Gaffney P.J., Curtis A.D. Thrombos. Haemostas. 53 : 134 – 136. 1985) ist 10mal höher, also etwa 0,5 U, die Konzentration der Stimulatoren beträgt etwa 20 μ g/Loch.)

20 Beispiel 3

Vergleich der thrombolytischen Wirkung von v-PA mit der von t-PA

25 Die thrombolytische Wirkung des neuen Wirkstoffs wird im Vergleich zu t-PA in einem neu entwickelten "Micro-clot-Lysis-Assay" (MCLA) untersucht. In die Löcher von Mikrotiterplatten werden je 100 μ l frisches humanes Vollblut pipettiert, mit je 10 μ l eines Gerinnung auslösenden Agens (Thromborel(R), Behring-Werke) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Blutgerinnsele werden zweimal mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, bevor sie mit 100 μ l autologem Plasma, welches zuvor durch Zentrifugation gewonnen worden ist, versetzt werden. Das Plasma wird anschließend mit t-PA bzw. v-PA in Konzentrationen von 1,56 – 12,5 U/ml versetzt. Die so behandelten Mikrotiter-Platten werden 18 h bei 37°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Platten auf einem Schütteltisch (Red Rotor) geschüttelt, bevor aus jedem Loch eine Plasmaprobe entnommen, 1 : 6 mit Aqua bidestillata verdünnt (führt zum Zerplatzen der durch die Lyse freigesetzten roten Blutzellen) und der freigesetzte rote Blutfarbstoff photometrisch bei 492 nm in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bestimmt wird.

30 Das Ergebnis des Versuchs ist der Abb. 6 zu entnehmen: Im Vergleich zu einem Standard-t-PA lysieren equieffektive Konzentrationen des neuen Wirkstoffs (ermittelt im International Clot-Lysis-Assay) humane Vollblutthromben etwa 4fach besser als t-PA. Bereits etwa 3 U/ml des neuen Wirkstoffs zeigen im beschriebenen Versuchsmodell eine signifikante thrombolytische Wirkung, während 3 U t-PA keine von der Kontrolle abweichenenden Resultate ergeben.

35 In einem ähnlichen Experiment wird die Zeitabhängigkeit der humanen Vollblutthrombolyse durch t-PA und durch v-PA untersucht.

40 Je 6,25 und 12,5 U t-PA und v-PA werden in dem beschriebenen Ansatz 23 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nach 15 Stunden wird alle 2 Stunden eine Probe entnommen und wie beschrieben für den photometrischen Test vorbereitet. Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt.

45 Der Eintritt der Thrombolyse, gemessen an der Freisetzung von roten Blutzellen aus dem Gerinnsele, ist unter Einsetzung des neuen Wirkstoffs deutlich schneller als unter t-PA 6,25 U des neuen Wirkstoffs erzielen nach 23 Stunden eine stärkere Thrombolyse als die doppelte Aktivität von t-PA (12,5 U).

50 Beispiel 4

Serinproteasen reagieren spezifisch mit dem "active site titrant" Disisoproylfluorophosphat (DIFP)

Der gereinigte Wirkstoff wird dazu auf pH 8,0 gepuffert und im Verhältnis 1 : 20 mit 3H-DIFP in Propylenglykol versetzt. Der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot des Ansatzes wird auf einem 12,5%igen SDS-Gel elektrophoresiert. Das Gel wird dann in Amplify(R) (Amersham) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend getrocknet. Dann wird das Gel für 4 Tage exponiert und anschließend der Röntgenfilm entwickelt. Serinproteasen, die das radioaktiv markierte DIFP inkorporiert haben, werden auf dem Film als geschwärzte Bänder sichtbar. t-PA ergibt eine leicht geschwärzte Hauptbande mit dem apparenten Molekulargewicht von 68 000 \pm 5000, der neue Wirkstoff hat eine stark geschwärzte Hauptbande von 40 000 \pm 3000 MW. Ein unter gleichen elektrophoretischen Bedingungen erhaltenes Kontrollgel wird mit 1% Triton X-100 gewaschen und anschließend auf ein fibrin- und plasminogenhaltiges Indikatorgel gelegt. Die Position der Aktivität des elektrophoresierten Wirkstoffs ist kongruent mit der geschwärzten Bande der 3H-DIFP markierten Serinprotease, die das aktive Prinzip des Wirkstoffs darstellt.

65 Beispiel 5

Wenn man t-PA in humanem Plasma bei 37°C inkubiert, nimmt die Konzentration von gerinnbarem Fibrino-

gen zeitabhängig ab. Dieses liegt in der relativen Fibrinspezifität von t-PA begründet und ist eine charakteristische Eigenschaft dieses Thrombolytikums. 3 mg gerinnbares humanes Fibrinogen werden in je 1 ml 50 mM Tris pH 7,4 40 mM NaCl gelöst und mit 1 μ M humanem Plasminogen versetzt. Ein Teil des aliquotierten Ansatzes wird mit 3,1, 6,25 und 12,5 U t-PA bzw. mit den gleichen Aktivitäten von v-PA versetzt. Ein dritter Ansatz ohne Plasminogenaktivator dient als Kontrolle. Es werden jeweils 6 Ansätze pro Behandlungs-Gruppe eingesetzt. Sofort nach Zugabe der Plasminogenaktivatoren werden aus allen Ansätzen je ein Aliquot entnommen und mit der Methode nach Clauss (Clauss V.A., Acta Haematol. 17 : 237 – 246, 1957) das gerinnbare Fibrinogen bestimmt. Ein Teil des Aliquots wird außerdem geelektrophoretisch analysiert. Weitere Aliquotentnahmen aus den bei 37°C inkubierten Ansätzen werden nach 2, 4 und 6 Stunden durchgeführt. Die Resultate der Fibrinogenmessungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

5

10

Tabelle 1

Inkuba- tions- zeit/h	t-PA (U/ml)		v-PA (U/ml)		K + Plg		15
	12,5	6,25	3,1	12,5	6,25	3,1	
0	10,3	9,7	9,1	10,5	10,3	10,1	10,0 [sec]
	10,0	9,1	10,6	10,4	9,7	10,4	9,7 [sec]
	10,2	9,4	9,9	10,5	10,0	10,3	9,9 [sec]
	12,6	11,3	10,5	10,0	9,7	8,9	9,5 [sec]
	12,8	11,0	10,8	9,4	9,6	9,8	9,7 [sec]
	12,7	11,2	10,7	9,7	9,7	9,4	9,6 [sec]
2			12,8		11,9	11,6	10,9 [sec]
			12,5		11,2	11,5	11,1 [sec]
			12,7		11,6	11,6	11,0 [sec]
	> 300		11,3		11,5	10,5	12,1 [sec]
			11,4		11,2	10,6	11,9 [sec]
			11,4		11,4	10,6	12,0 [sec]
4			11,4		11,4	10,6	12,0 [sec]
			14,5		13,1	12,8	12,4 [sec]
			13,7		13,1	11,9	12,6 [sec]
	> 300		14,1		13,1	12,4	12,5 [sec]
			18,6		11,6	13,2	11,8 [sec]
					12,1	14,2	12,4 [sec]
6					11,9	13,7	12,1 [sec]
			13,9	14,4	17,6	12,2	12,6 [sec]
			13,1	13,6	17,1	15,8	12,3
	> 300				13,8	17,1	11,8 [sec]
					12,3	12,8	12,2 [sec]
					12,1	12,2	13,0 [sec]
					12,2	121,0	13,3 [sec]
						12,1	13,2 [sec]

20

30

35

40

45

Plg = 1 μ M Plasminogen, 40 μ l/ml Ansatz [50 U/ml]

3 mg gerinnbares Fibrinogen/ml, Ansatz in 50 mM Tris, 40 mM NaCl, pH 7,4 [Verdünnungspuffer]

Aufgeführt sind die Gerinnungszeiten nach Clauss in Sekunden. Bereits nach zweistündiger Inkubation kann in keinem der t-PA-haltigen Ansätze gerinnbares Fibrinogen festgestellt werden, die Gerinnungszeiten lagen > 300 s. Hingegen gibt es weder in den Kontrollansätzen noch in den Ansätzen, die mit dem neuen Wirkstoff versetzt sind, Zeichen eines Fibrinogenabbaus. Dieses Experiment verdeutlicht die wesentlich höhere, wenn nicht gar absolute Fibrinspezifität des neuen Wirkstoffs v-PA im Vergleich zu t-PA.

50

In der gelektrophoretischen Analyse der Aliquots läßt sich weiterhin nachweisen, daß das Fibrinogen in den Ansätzen mit dem neuen Wirkstoff auch nach 6ständiger Inkubation nicht vom Fibrinogen in den Kontrollansätzen unterscheidbar ist, wohingegen in den Ansätzen mit t-PA bereits nach 2 Stunden nur degradiertes Fibrinogen nachweisbar ist.

55

Beispiel 6

60

Einfluß von v-PA auf ein rekonstituiertes Clot-Lyse-System (International Clot-Lysis-Assay)

Gereinigtes humanes Fibrinogen wird in Gegenwart einer konstanten Menge humanem Plasminogen und verschiedenen Konzentrationen an Plasminogenaktivator mit Thrombin zur Gerinnung gebracht. In dem entstehenden Gerinnsel wird nun das Plasminogen durch die Plasminogenaktivatoren in Plasmin umgewandelt, welches wiederum den Faserstoff Fibrin im Gerinnsel auflöst. Gemessen wird die Zeit zwischen Zugabe des Thrombins und der vollständigen Auflösung des Gerinnsels und doppelt logarithmisch gegen die Plasminogenaktivatorkonzentration aufgetragen. 12,5 – 100 μ l einer gepufferten Lösung des gereinigten Wirkstoffs werden

65

nach oben angeführtem Prinzip getestet und gegen 12,5 – 100 IU t-PA verglichen. Das Ergebnis ist in der Abb. 8 dargestellt:
 Der neue Wirkstoff ergibt im Vergleich zu t-PA eine parallele Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 7). 100 µl einer Lösung des aufgereinigten Wirkstoffs enthalten entsprechend der Versuchsdaten etwa 40 U an t-PA-vergleichbarer Aktivität.

Der Test im einzelnen

Lyophilisiertes Test-Thrombin (Behring, Marburg) wird in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Dieses ergibt eine Aktivität von 30 IU/ml. Humanes Plasminogen (Kabi, München) wird in 2 mM HCl + 50% Glycerin + 5 g/l PEG 6000 gelöst. Dieses ergibt eine Aktivität von 10 IU/ml. Humanes Fibrinogen (Kabi, München) wird in einem Phosphatpuffer der folgenden Zusammensetzung auf eine Konzentration von 2 mg/ml gerinnbares Protein gebracht: 1,605 g/l KH₂PO₄; 8,58 g/l Na₂HPO₄ · 2 H₂O; 100 1/l Tween 80 – 500 mg/l HSA. Das Standard-t-PA wird auf eine Aktivität von 1000 IU/ml verdünnt.

20 µl Plasminogen + 100 µl Thrombin werden in ein Teströhren pipettiert und bei 37°C inkubiert. 1 ml Fibrinogen und 12,5 – 100 µl Plasminogenaktivator werden gleichzeitig zugesetzt und die Stoppuhr gestartet. Nach 2 min wird eine Glaskugel (Durchmesser 6 mm) auf das Gerinnsel gelegt. Wenn die Glaskugel den Boden des Teströhrens erreicht hat, wird die Uhr gestoppt und die Zeit registriert.

Bindung von v-PA und t-PA an Lysinsepharose 4B (Abb. 9):
 Die Plasminaktivatoren wurden auf den entsprechenden pH gebracht und bei diesem Wert mit der Lysinsepharose behandelt. Die Lysinsepharose wurde intensiv gewaschen und in den vereinigten Überständen die Aktivität bestimmt. Elutionsversuche konnten mit den geringen Mengen an v-PA nicht durchgeführt werden.

Patentansprüche

1. Thrombolytikum v-PA mit einer in Gegenwart von Fibrin fibrinolytischen Wirksamkeit aus dem Speichel von Federmäusen der Gattung Desmodus spec. gekennzeichnet durch
 - a) ein gelelektrophoretisch ermitteltes Molekulargewicht von 40 000 ± 3000;
 - b) eine Elution der Aktivität des Wirkstoffes von einer Gelfiltrationssäule bei einem Molekulargewicht 40 000 ± 3000;
 - c) isoelektrische Punkte (pI) zwischen 6,8 und 8,5;
 - d) Einbau von ³H-Diisopropylfluorophosphat (Serinprotease);
 - e) eine fehlende immunologische Identität mit t-PA;
 - f) eine fehlende Hemmung durch den Plasminogenaktivator-Inhibitor PAI-2;
 - g) seine Hydrolysefähigkeit der chromogenen Peptide H-D-Ile-Pro-Arg-pNa, H-D-Val-Leu-Lys-pNa und Glu-Gly-Arg-pNa;
 - h) seine fehlende Hydrolysefähigkeit des chromogenen Peptids H-D-Phe-Pip-Arg-pNA;
 - i) seine fehlende Fähigkeit, Lysehöfe auf Caseinplatten zu erzeugen;
 - j) seine Bindungsfähigkeit bei pH 7,5 an Zn⁺⁺-Chelat-Sepharose;
 - k) seinen in einem rekonstituierten, gerinnbaren in-vitro-System in Gegensatz zu t-PA fehlenden Fibrinogenabbau.
2. Verfahren zur Isolierung des Thrombolytikums v-PA aus dem Speichel von Desmodus spec. gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den zentrifugierten Speichel in einem Puffer aufnimmt, über eine Zn⁺⁺-Chelat-Sepharose-Säule chromatographiert, nach Waschen der Säule den Wirkstoff v-PA quantitativ eluiert, die gesammelten Fraktionen über Superose 12 in Abwesenheit von Salzen gelfiltriert und anschließend nochmals in Gegenwart einer physiologischen Salzlösung gelfiltriert.
3. Arzneimittel auf Basis der Verbindungen gemäß Anspruch 1 mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

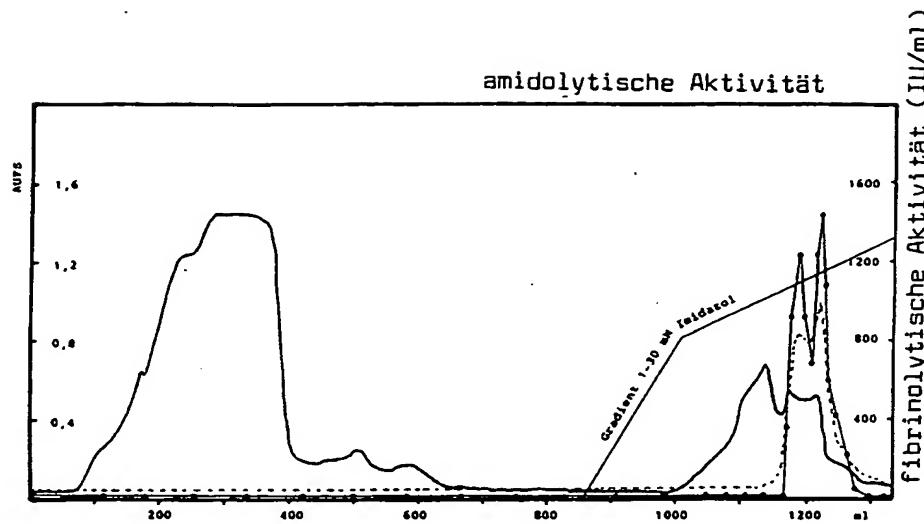


ABBILDUNG 1

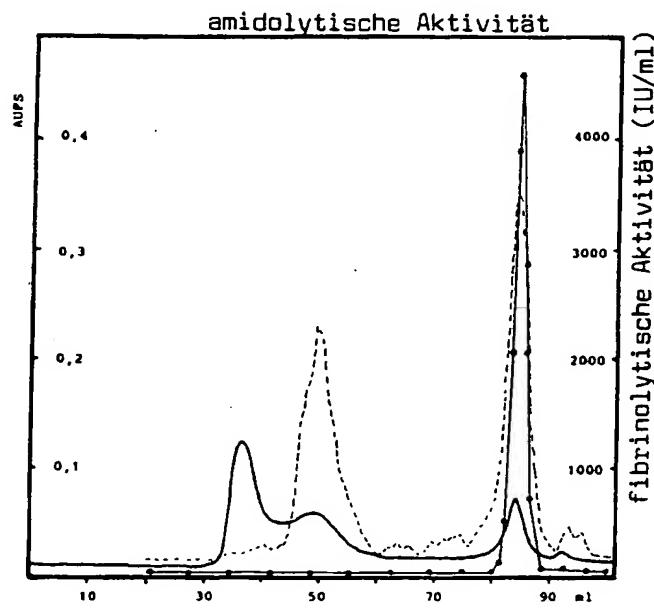


ABBILDUNG 2

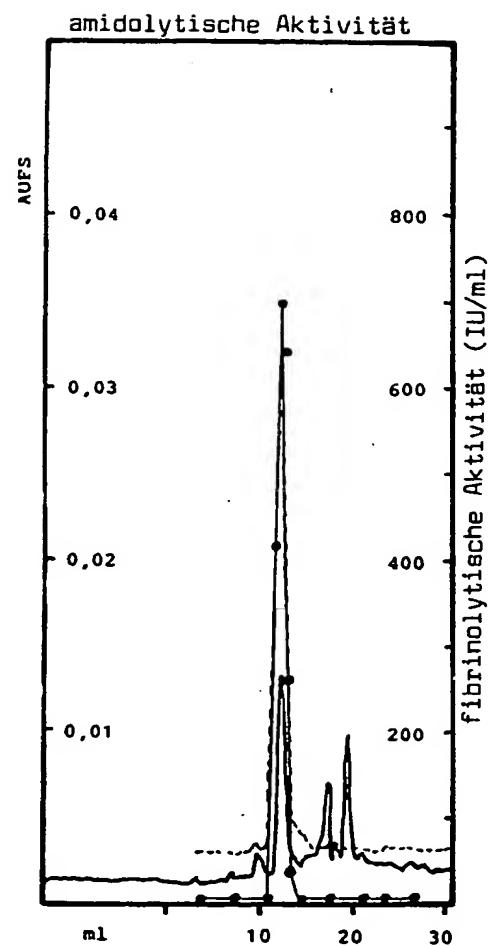
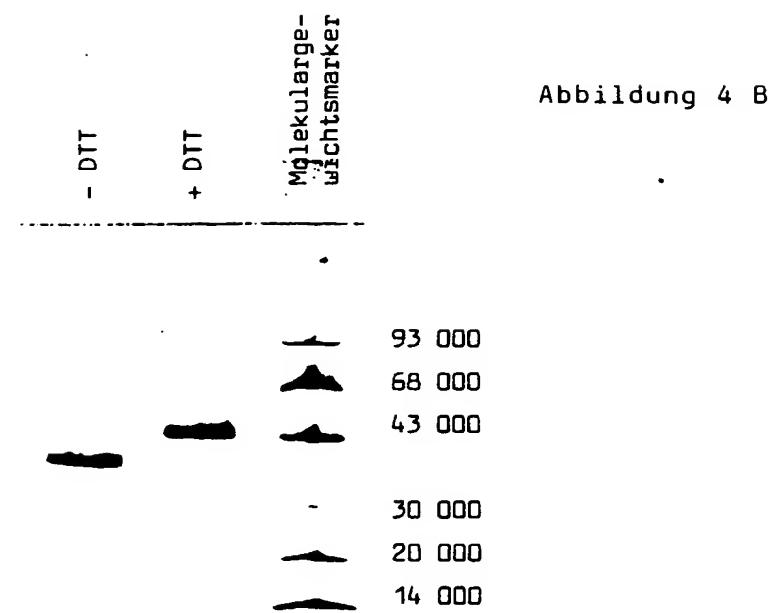
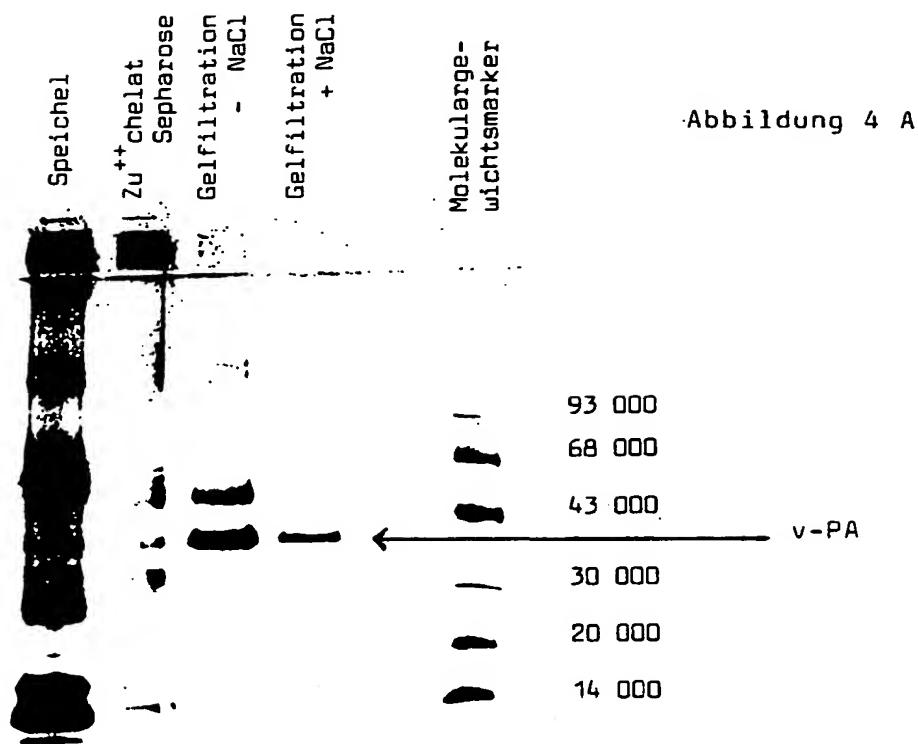


ABBILDUNG 3



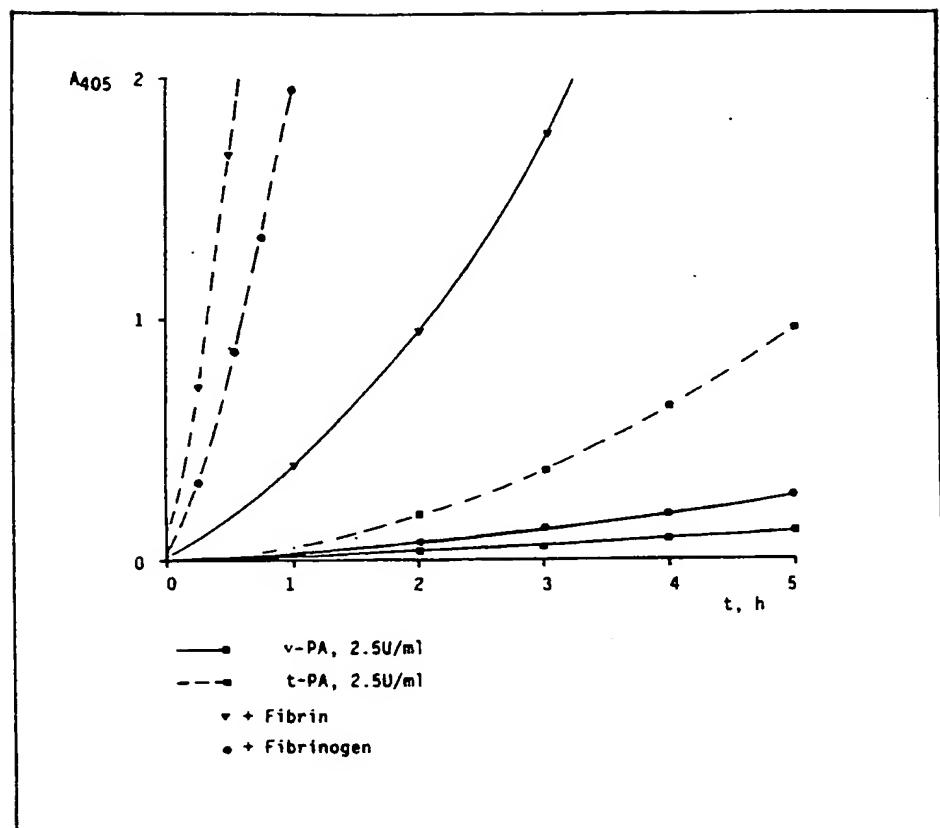


ABBILDUNG 5

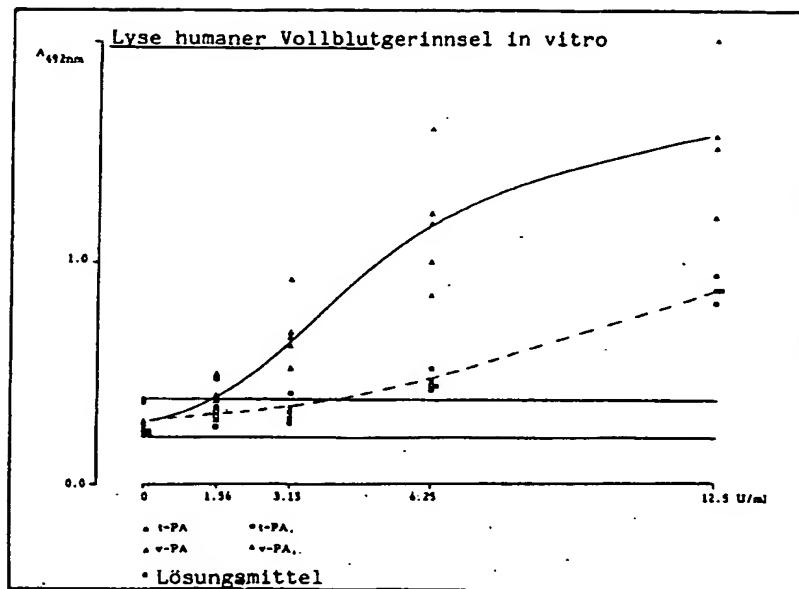


Abbildung 6

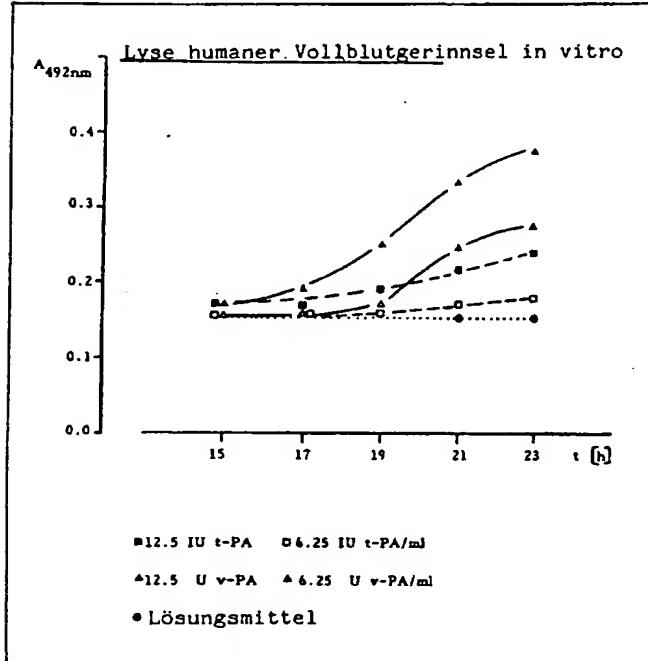


Abbildung 7

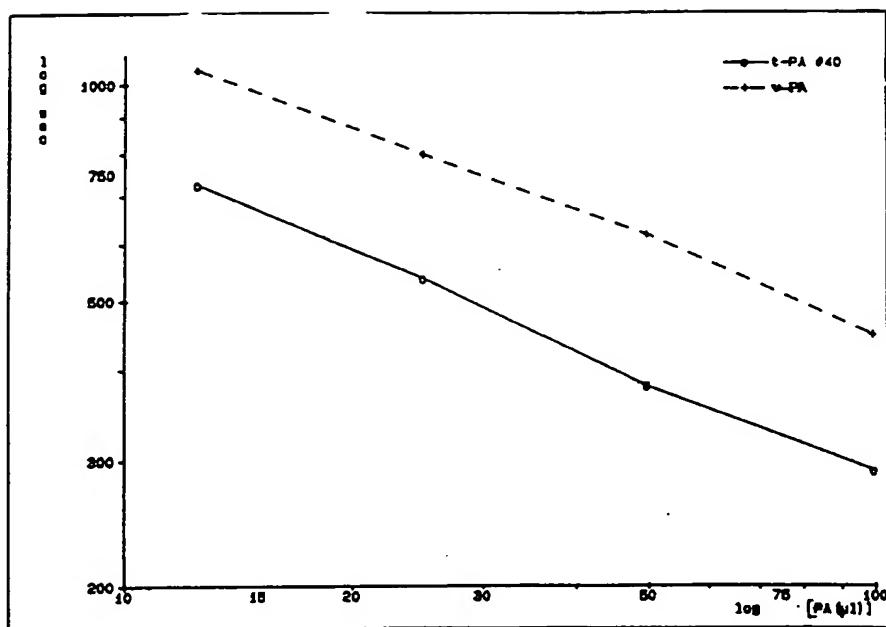


Abbildung 8

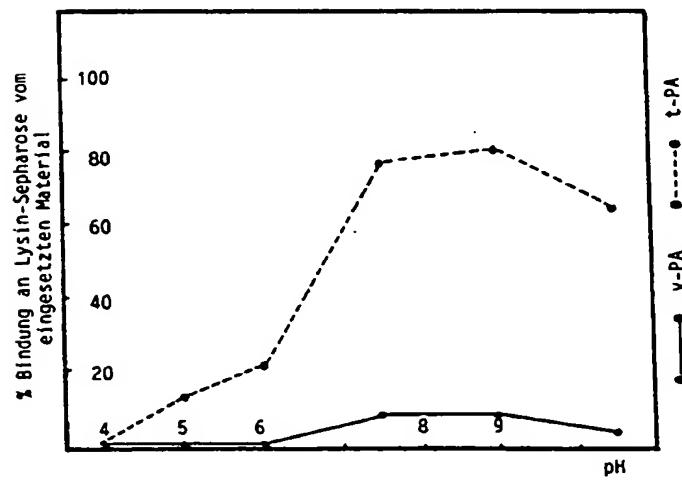


Abbildung 9